

Comparison of Collagen-coated Polyethylene Terephthalate Disc Plate and Shell Vial Culture Method for the Isolation of *Chlamydomphila pneumoniae*

Mi Hye Kim, Won Kil Lee

Department of Clinical Pathology, School of Medicine, Kyungpook National University, Daegu, Korea

Background: *Chlamydomphila pneumoniae* is one of the major respiratory infectious pathogens and can be accurately diagnosed by cell culturing. The author performed this study to compare the usefulness of the collagen-coated polyethylene terephthalate (PET) disc culture method and that of the shell vial method.

Methods: Twenty-nine sputums and 17 blood specimens collected from 46 patients for *C. pneumoniae* culture were inoculated into HeLa-229 cell monolayers cultured in shell vials and polyester plates. After incubation, they were stained using the indirect immunofluorescent method with genus-specific FITC-conjugated anti-chlamydia antibody. When both results were inconsistent, microimmunofluorescence results were used.

Results: HeLa-229 cells successfully formed monolayers in shell vials and collagen-coated PET plates in all cases. Positive inclusion bodies in HeLa-229

cells of shell vials and PET plates for *C. pneumoniae* culture were similarly stained with the indirect immunofluorescent method. Both methods showed consistent results with 20 positive and 22 negative cases. The total agreement between the PET plate and shell vial was excellent (91.3%, $k=0.826$).

Conclusion: The collagen-coated PET disc culture method showed highly consistent results with that of the shell vial method, and no technical differences were experienced between the two methods. Therefore, the author concluded that the shell vial method could be replaced by the PET plate method for detection of *C. pneumoniae*. (Korean J Clin Microbiol 2010;13:73-78)

Key Words: Collagen-coated PET disc plate, Shell vial, *Chlamydomphila pneumoniae*, Cell culture

서 론

Chlamydiae는 peptidoglycan 층이 없는 그람 음성 간균이다. 감염형인 기본체(elementary body)와 증식형인 망상체(reticulate body)의 형태로 세포 내에서만 생존과 증식을 하는 독특한 생활사를 가진다[1]. 그렇기 때문에 다른 감염균과는 달리 진단을 위한 균 배양이 매우 어렵다. Chlamydia 속은 1999년 16S와 25S 라이보솜 유전자의 염기서열 분석을 통해 Chlamydia와 Chlamydomphila 두 가지로 재분류되었다. 이에 따라 *Chlamydia trachomatis*는 속명이 바뀌지 않고, *Chlamydia pneumoniae*와 *Chlamydia psittaci*는 *Chlamydomphila*로 속명이 바뀌게 되었다[2].

*C. pneumoniae*는 *Chlamydia* 종들 중에서 세 번째로 명명되었으며 *C. trachomatis*, *C. psittaci*와 달리 서양배 모양(pear shape)

의 기본체에 넓은 원형질막 주위공간(periplasmic space)과 작은 원형 구조(miniature body)를 가진다[3]. *C. pneumoniae*는 호흡기 감염의 중요한 원인균 중 하나로 지역사회획득 폐렴의 10~15%를 차지하는 것으로 보고되고 있으며[4] 20세까지 성인의 50%에서, 60~70세에는 70~80%까지 항체 양성률을 보이고 재감염이 흔한 것으로 알려져 있다[5]. 최근 동맥경화증[6], 다발성 경화증[7], 알츠하이머 병[8], 반응성 관절염[9], 천식[10]과의 관련성이 알려지면서 관심이 증가하고 있다.

C. pneumoniae 진단을 위해 혈청학적 방법과 polymerase chain reaction (PCR), 세포 배양법 등의 방법이 이용되고 있다[11,12]. 혈청학적 방법은 *C. pneumoniae* 특이 항체를 검출하는 것으로 microimmunofluorescence (MIF) 검사가 추천되고 있다. 그러나 여러 *Chlamydia* 종간의 교차 반응, 회복기 혈청의 필요, 후향적 진단 방법이라는 점, 성인에서 IgG 항체의 양성률이 높고 재감염에서 IgM 항체가 검출되지 않는 점 등의 문제가 있다. PCR법은 신속한 검사로 상품화된 키트가 있어 쉽게 사용할 수 있고, Centers for Disease Control and Prevention 등의 권고사항을 보면 4가지 PCR 검사법이 신뢰성을 인정받았지만[11], 연

Received 2 November, 2009, Revised 5 March, 2010

Accepted 20 April, 2010

Correspondence: Won Kil Lee, Department of Clinical Pathology, School of Medicine, Kyungpook National University, 50, Samduk 2-ga, Jung-gu, Daegu 700-721, Korea. (Tel) 82-53-420-5292, (Fax) 82-53-426-3367, (E-mail) leewk@knu.ac.kr

구마다 다양한 민감도와 특이도를 보여주고 있으며 오염으로 인한 위양성과 위음성 결과 때문에 임상에서의 적용을 위해 연구가 더 필요한 실정이다. 세포 배양법은 표준 진단 방법으로 활용되고 있지만 검사법이 매우 복잡하여 숙련된 기술과 많은 경험을 요하고 민감도가 낮으며 *C. pneumoniae* 봉입체와 형광 염색 후 생긴 인공물(artifact) 간의 구별이 어려운 단점이 있다.

아직까지 *C. pneumoniae* 감염 진단을 위한 표준화된 검사 방법(gold standard)이 없는 상태로, *C. pneumoniae*의 배양이 어렵기 때문에 급성기와 회복기 혈청을 이용해 특이 항체를 검출하는 방법이 가장 유용하게 사용되고 있다[11,12]. 그러나 무엇보다도 정확한 진단을 위해서는 호흡기 검체 뿐 아니라 만성 질환과의 연관성을 알아보기 위해 다양한 검체의 세포 배양을 통해 *C. pneumoniae*를 확인하는 것이 중요하므로 이에 대한 다양한 연구가 필요하다.

저자의 병원 검사실에서는 세포주로 HeLa-229 세포를 이용하여 shell vial 내 둥근 cover glass 위에 단층세포(monolayer)를 만든 후 검체를 접종하여 *C. pneumoniae* 배양을 실시하고 있다. 최근 콜라겐이 코팅된 polyethylene terephthalate (PET) 디스크를 polyester plate 용기에 넣어 사용하는 제품(CorePath, Daegu, Korea)이 개발되어 세포 배양에 이용되고 있다. PET 디스크는 투명하고 평탄하여 세포의 배양을 직접적으로 관찰할 수 있고 세포의 부착을 향상시켜 탈락을 줄여주며 부드러운 재질로 되어 있어 다양한 염색이나 후속 검사를 위해서 disc를 여러 개로 절단하여 이용 가능한 장점이 있다. 또한 세포를 배양한 후 cryovial에 넣어 질소 탱크에 보관하였다가 필요시에 세포를 해동하여 사용할 수 있다.

이에 저자는 *C. pneumoniae*를 검출하는데 PET 디스크 plate를 유용하게 이용할 수 있는지 알아보고 기존의 방법과 비교하기 위해 본 연구를 실시하였다.

대상 및 방법

1. 연구 대상

2007년 12월부터 2008년 5월까지 기침, 객담, 호흡곤란 등의

호흡기 증상을 주소로 본원에 내원하여 *C. pneumoniae* 배양이 의뢰된 환자 중에서 검체 채취 용기가 부적합하거나 검체가 오래 방치되거나 오염된 경우와 배양 과정 중에 오염이 의심되는 경우를 제외한 46명을 대상으로 하였다. 그 중 29명은 객담을 검체로 사용하였고, 17명은 혈액을 검체로 사용하였다. 대상자들은 남자 30명, 여자 16명이었고, 나이는 22세에서 91세 사이였으며 평균 64.9세였다.

배양을 위해 shell vial과 PET 디스크 plate (4-well)를 이용하였고(Fig. 1), 결과가 상이한 경우 MIF 결과를 비교하였다.

2. 방법

1) 검체 처리: 객담은 오염되지 않도록 조심해서 채취한 후 신속히 검사실로 운반해 sucrose phosphate glutamate (SPG) 수송 배지에 넣은 후 사용하였다. EDTA를 사용한 혈액은 Ficoll-Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)에 중첩시켜 원심분리한 후 단핵세포를 분리하여 SPG 수송 배지에 넣어 준비하였다. 24시간 이내에 검사를 실시하지 못할 경우에는 위와 같이 검체를 처리하여 SPG 수송 배지에 넣어 -70°C 냉동고에 보관하였다[13].

2) 세포 배양: *C. pneumoniae*를 배양하기 위한 세포주는 HeLa-229 세포를 이용하였다. 25 cm² culture flask (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)에서 배양된 HeLa-229 세포의 단층을 도립위상차 현미경(inverted phase-contrast microscope, Olympus IM, Tokyo, Japan)으로 확인하였다.

Culture flask에 배양된 세포를 trypsin 1 mL를 사용하여 분리한 후 shell vial과 PET 디스크 plate에 세포부유액($1.5 \times 10^5/\text{mL}$)과 성장 배지를 넣어 5% CO₂, 37°C에서 48시간 동안 배양하여 단층세포를 만들었다. 성장 배지는 RPMI에 10% fetal calf serum을 첨가하여 만들었다. SPG에 들어있는 검체는 vortex mixer로 1분간 진탕한 후 200 xg로 10분간 원심분리하여 상청액 0.3 mL를 배양된 단층세포에 접종하였다. 그리고 검체를 접종한 shell vial과 polyester plate를 2,000 xg에서 1시간 동안 원심분리한 후 유지 배지 1 mL를 넣어 다시 5% CO₂, 37°C에서 72시간 동안 배양하였다. 배양 유지 배지는 RPMI, 2% fetal calf

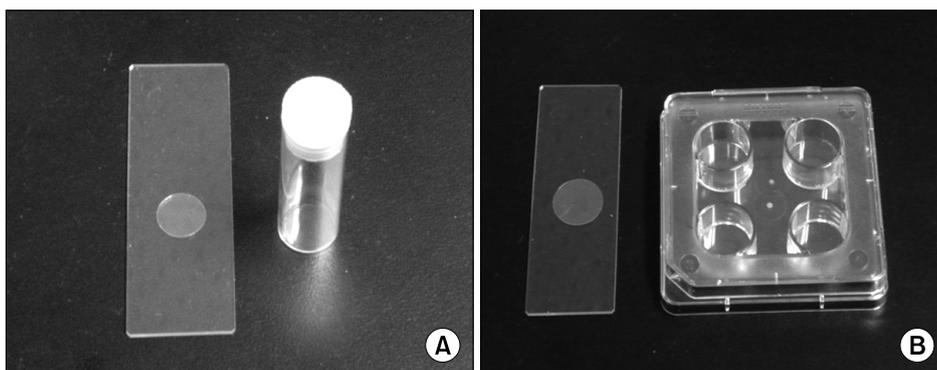


Fig. 1. (A) Shell vial and round cover glass (12 mm). The cover-glass is located onto the bottom of the shell vial. (B) Collagen-coated polyethylene terephthalate (PET) plate (4-well) and PET disc (15 mm). The PET discs are located onto the bottoms of the wells.

serum과 cycloheximide (1 μ g/mL)를 이용해 만들었다. 검사 시마다 양성 대조 검체를 표준 균주(TWAR-183)를 사용해서 동시에 배양하였다.

3) 면역형광염색 및 결과 판독: 간접면역형광염색을 하기 위해 배양이 끝난 후 배지를 버리고 100% methanol을 이용하여 세포를 고정시킨 후 *Chlamydia* genus-specific monoclonal antibody (한양대학교 제조) 0.2 mL를 첨가하여 37°C에서 40분간 항온 처리하였다. Shell vial과 PET 디스크 plate에서 각각 cover glass와 PET disc를 조심스럽게 꺼내 5회 세척하여 슬라이드 위에 올려 놓고 polyclonal rabbit anti-human IgG/FITC (DakoCytomation, Glostrup, Denmark)를 30 μ L 첨가하여 37°C에서 45분간 항온 처리한 후 형광현미경으로 봉입체를 관찰하였다. 형광염색된 봉입체가 한 개 이상 있으면 양성으로 판정하였다.

4) 통계: 통계분석 프로그램은 SPSS version 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하였다. 두 검사 간 양성률 비교는 McNemar 검정으로, 일치율은 카파값으로 분석하였다.

결 과

1. HeLa-229 세포 배양 결과 비교

HeLa-229 세포단층은 모든 shell vial의 cover glass와 PET 디스크에서 관찰되었다. 48시간 배양 후 크고 불규칙한 모양의 세포질을 가진 세포들이 무리 지어 바닥에 붙어 70~80% 정도의 세포단층을 형성하였다(Fig. 2).

2. *C. pneumoniae* 배양 결과 비교

모든 검사의 양성 대조군에서 양성 결과를 확인하였다. 양성인 경우 세포질 내에 하나의 둥근 봉입체가 형광 염색되었다(Fig. 3).

46검체 중 shell vial 배양검사서 양성은 22검체로 47.8%의 양성률을 보였고, PET plate를 이용한 경우에서도 22검체가 양성으로 47.8%의 양성률을 보여 두 검사 간 양성률이 동일하였다. 두 검사법에서 판정이 일치하는 경우는 양성 20예와 음성

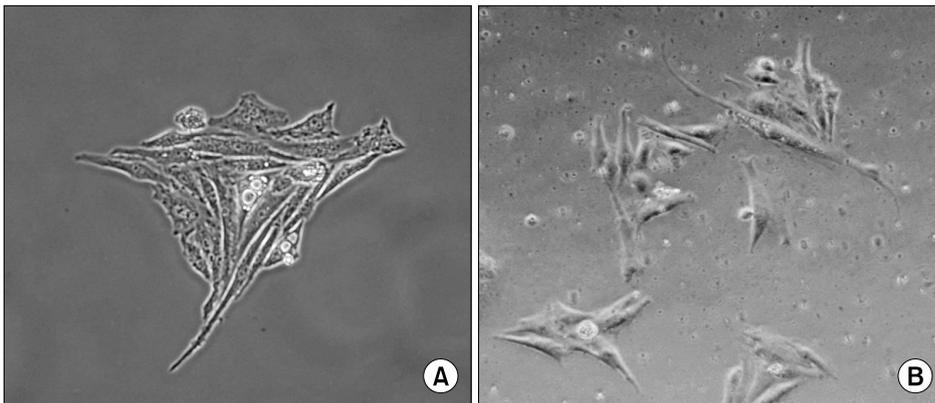


Fig. 2. A monolayer of HeLa-229 cells with the unoccupied surface and cell boundary and the condensed nuclear chromatin using inverted phase-contrast microscopy ($\times 400$). The HeLa-229 cells were cultivated at 37°C with 5% CO₂ in shell vial (A) and collagen-coated polyethylene terephthalate (PET) plate (B).

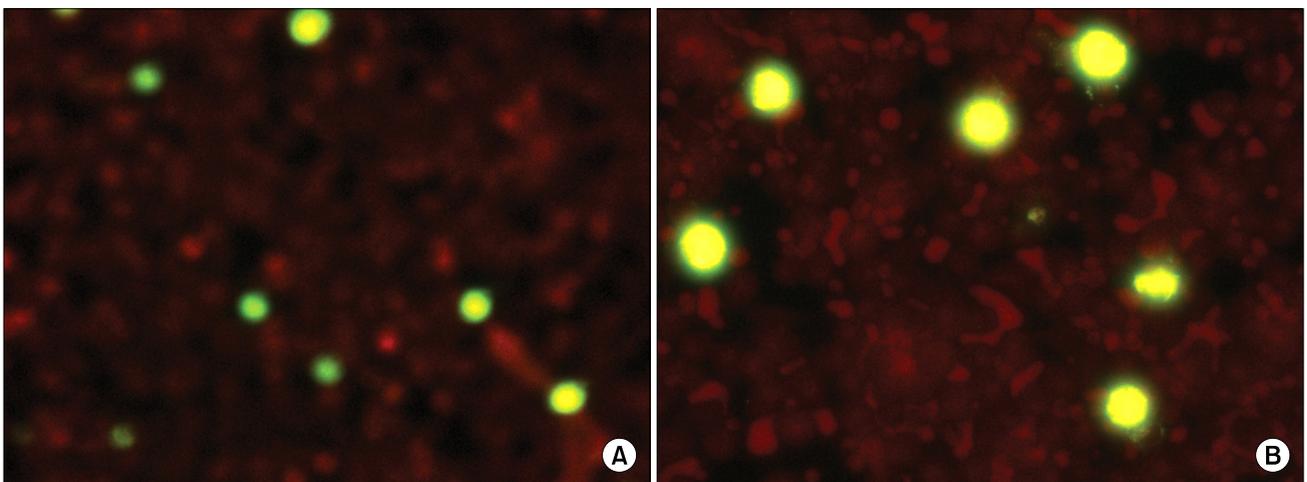


Fig. 3. Positive inclusion bodies in shell vial (A) and collagen-coated polyethylene terephthalate (PET) plate (B) stained with indirect immunofluorescent method using genus-specific FITC-conjugated anti-chlamydia antibody ($\times 200$).

Table 1. Comparison of collagen-coated polyethylene terephthalate (PET) plate and shell vial culture method for detection of *C. pneumoniae*

	Shell vial (+)	Shell vial (-)	Total
PET plate (+)	20	2	22
PET plate (-)	2	22	24
Total	22	24	46

22예, 총 42예로 91.3%의 일치율을 보였으며 카파값 0.826로 매우 우수한 일치도를 나타내었다(Table 1). 검체별로 분류해 보면, 객담 29검체 중에서 shell vial 양성은 15예, PET plate 양성 16예이었고 혈액 17검체 중에서는 shell vial 양성 7예, polyester plate 양성 6예로, 각 검체별로 두 검사의 양성률은 차이가 없었다($P=1.0$).

두 검사 간 판정이 달랐던 경우는 shell vial에서 양성이면서 PET plate에서 음성인 경우가 2예, shell vial에서 음성이면서 PET plate에서 양성인 경우가 2예였다. 배양 결과를 MIF 결과와 비교해 보면, 전자의 경우 모두 IgM 1:16으로 양성 소견을 보였으며 후자의 경우 한 명은 IgM 1:16으로 양성, 다른 한 명은 IgM 1:8 미만으로 음성 소견을 보였다.

고 찰

Chlamydiae는 편성 세포 내 기생성 세균(obligate intracellular bacterial pathogen)으로, 이와 같이 세포 내에서 생존하고 증식하는 세균과 바이러스의 검출을 위해서는 세포 배양법을 사용해야 한다[14]. 전통적인 세포 배양은 유리나 플라스틱 시험관의 한쪽 벽면에 세포 단층을 만들고 검체를 접종시켜 계속 배양하면서 세포변성 효과(cytopathic effect)를 관찰하는 것이다. Shell vial 배양법은 전통적인 세포 배양의 변형 검사법으로 coverslip이 들어있는 shell vial 튜브에 적절한 세포주의 단층을 만들고 검체를 접종시킨 후 면역형광염색을 하여 봉입체를 확인하는 것이다. 주로 사용되는 coverslip은 얇은 유리로 만들어져 있어 미끄럽고 깨지기 쉬워 다루기가 쉽지 않다.

세포 배양법은 살아있는 세포에 검체를 접종해야 하기 때문에 일반 세균 배양보다 쉽지 않고, 특히 *C. pneumoniae*는 *C. trachomatis*에 비해 배양하기가 어렵다고 알려져 있다[15]. 균의 감염 부위에 쉽게 접근할 수 없기 때문에 실제 사용하는 검체에 균이 적거나 없을 수 있고, 검체 수송 과정에서 쉽게 비활성화되며 균의 성장 속도가 느려 2회 이상의 계대배양을 실시하여야 봉입체를 확인할 수 있기 때문이다.

지금까지 효과적인 *C. pneumoniae* 배양을 위해 여러 연구가 시도되었다. Kuo와 Grayston[15]은 DEAE-dextran으로 전처리한 HeLa-229 세포를 이용해 배양 온도를 37°C가 아닌 35°C에

맞추고, 원심분리와 cycloheximide가 포함된 배지를 사용하여 감염력을 증가시켰으며, Maass 등[16]은 human line (HL) 세포에 serum-free media를 사용해 배양하니 봉입체 수가 증가하는 것을 보고하였으며, Pruckler 등[17]과 Tjhie 등[18]은 배양 시간을 늘리고 추가 원심분리하여 결과를 향상시켰다. Kazuyama 등[19]의 연구에서는 trypsin이나 EDTA로 전처리한 HL 세포에서 봉입체가 증가하였고, Roblin 등[20]과 Kim 등[13]은 다양한 세포주 중 HEp-2 세포가 가장 우수한 감염력을 보였다고 보고하였다. 아직까지 배양 수율이 좋지 않고 표준화된 배양 방법도 없는 실정이지만, HEp-2 세포나 HL 세포를 fetal calf serum이 포함된 배지로 배양 후 검체를 접종, 원심분리를 시행하고 cycloheximide가 포함된 배지로 5% CO₂, 35°C에서 배양한 다음 genus-specific monoclonal antibody로 염색하여 판독한 후 species-specific monoclonal antibody로 염색해서 확진하되 2회 계대배양을 하도록 권고하고 있다[11].

본 연구에서는 *C. pneumoniae* 검출을 위해 shell vial과 PET plate를 이용해 세포 배양법을 실시하였는데, HeLa-229 세포를 48시간 배양 후 shell vial의 cover glass와 PET plate의 PET 디스크 위에 70~80%의 세포단층이 형성되었음을 확인할 수 있었고, 양성인 경우 세포질 내에 하나의 둥근 봉입체가 형광 염색되었다. 결과 판정에서도 47.8%로 동일한 양성률을 나타냈고, 전체 91.3%의 우수한 결과 일치율을 보였다. 또한 배양을 실시하면서 plate와 disc를 다루는 데에도 크게 어려움이 없어 shell vial을 대신해서 PET plate를 사용하여도 좋을 것으로 판단된다. 다만 *Chlamydia* 배양검사 의뢰 건수가 적은 경우 well 간의 오염 방지를 위해 plate 형태보다는 shell vial과 같이 하나씩 사용할 수 있는 용기가 더 편리할 것으로 생각된다.

기존에 발표된 논문들[21-25]에 비해 양성률이 높았던 이유는 배양 검사가 의뢰된 총 117검체 중에서 잘못된 검체 용기를 사용하거나 오염되고 검사 시간이 지연된 경우와 배양 과정 중에 오염이 의심되는 경우를 제외한 46검체의 결과만을 비교하였고, 대부분의 검체는 응급실 내원 당일 신속히 검사가 의뢰되었기 때문이다. 또한 간접면역형광염색을 위해 *Chlamydia* genus-specific monoclonal antibody를 사용하였기 때문에 비특이적인 반응도 고려해야 하겠지만, *C. pneumoniae*-specific monoclonal antibody를 사용하여 추가 확인 검사를 시행하지 못하였다. 검사 결과가 달랐던 4예 중 shell vial에서 양성이면서 PET plate에서 음성인 2예와 shell vial에서 음성이면서 PET plate에서 양성인 1예는 모두 MIF 결과가 IgM 1:16으로 양성 소견을 보였는데 이 중 PET plate에서 음성을 보인 2예에서는 4-well plate 사용으로 다른 검체와 함께 검사하기 위해 shell vial보다 검체를 더 오래 보관 후 실시하였기 때문에 균의 활성이 떨어져 음성으로 나타날 수 있었을 것으로 추측된다. Shell vial에서 음성이면서 PET plate에서 양성인 다른 1예는 MIF 결과가 IgM negative, IgG 1:32로 음성 소견을

보였지만 83세 환자로 재감염의 가능성이 있어 양성을 완전히 배제할 수는 없었다. 정확한 판정을 위해서는 회복기 혈액으로 IgG 추적 검사를 실시하거나 계대배양이나 종특이적 단클론 항체 염색, PCR 검사를 추가로 시행하여야 할 것으로 보인다 [11,12].

본 연구는 검체수가 적고 주로 고연령대 환자가 많았다는 제한점이 있지만 10년 이상의 *C. pneumoniae* 배양 검사 경험을 바탕으로 shell vial과 PET plate만 달리하고 동일한 검사 조건과 방법으로 실시되었기에 결과 비교에는 크게 무리가 없을 것으로 생각된다. 그러나 5일 이상의 긴 배양기간에 비해 환자들의 재원 기간이 짧아 이후의 추적 검사나 추가 검사를 시행하지 못하였는데 이에 대한 보완이 필요할 것으로 생각된다. PET plate를 이용한 *C. pneumoniae* 배양은 shell vial과 비슷한 결과를 보여 앞으로 검사실에서 사용 가능하다고 여겨진다. PET 디스크는 세포의 동결과 해동이 수월하여 세포주를 배양하여 디스크를 바로 냉동 보관할 수 있고, 디스크를 여러 개로 절단할 수 있으므로 면역형광염색뿐 아니라 Giemsa 염색이나 요오드 염색을 동시에 시행할 수 있을 것이다. 또한 *C. pneumoniae* 진단을 위한 배양 외에도 항생제 감수성 검사, MIF 검사를 위한 항원 추출, 새로 소개되고 있는 Chlamydiae FISH (fluorescence in situ hybridization) 검사[26]에도 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구를 위해 도움을 주신 경북대학교 의학전문대학원 병리학교실 배한익 교수님과 (주)코아캐스에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Hammerschlag MR. The intracellular life of chlamydiae. *Semin Pediatr Infect Dis* 2002;13:239-48.
- Everett KD, Bush RM, Andersen AA. Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:415-40.
- Chi EY, Kuo CC, Grayston JT. Unique ultrastructure in the elementary body of *Chlamydia* sp. strain TWAR. *J Bacteriol* 1987;169:3757-63.
- Kuo CC, Jackson LA, Campbell LA, Grayston JT. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR). *Clin Microbiol Rev* 1995;8:451-61.
- Blasi F, Tarsia P, Aliberti S. *Chlamydia pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect* 2009;15:29-35.
- Wong YK, Dawkins KD, Ward ME. Circulating *Chlamydia pneumoniae* DNA as a predictor of coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1999;34:1435-9.
- Layh-Schmitt G, Bendl C, Hildt U, Dong-Si T, Jüttler E, Schnitzler P, et al. Evidence for infection with *Chlamydia pneumoniae* in a subgroup of patients with multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2000;47:652-5.
- Balin BJ, Gérard HC, Arking EJ, Appelt DM, Branigan PJ, Abrams JT, et al. Identification and localization of *Chlamydia pneumoniae* in the Alzheimer's brain. *Med Microbiol Immunol* 1998;187:23-42.
- Cascina A, Marone Bianco A, Mangiarotti P, Montecucco CM, Meloni F. Cutaneous vasculitis and reactive arthritis following respiratory infection due to *Chlamydia pneumoniae*: report of a case. *Clin Exp Rheumatol* 2002;20:845-7.
- Hahn DL, Peeling RW, Dillon E, McDonald R, Saikku P. Serologic markers for *Chlamydia pneumoniae* in asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2000;84:227-33.
- Dowell SF, Peeling RW, Boman J, Carlone GM, Fields BS, Guarner J, et al. Standardizing *Chlamydia pneumoniae* assays: recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention (USA) and the Laboratory Centre for Disease Control (Canada). *Clin Infect Dis* 2001;33:492-503.
- Kumar S and Hammerschlag MR. Acute respiratory infection due to *Chlamydia pneumoniae*: current status of diagnostic methods. *Clin Infect Dis* 2007;44:568-76.
- Kim KS, Choi TY, Sohn HE. A study for culture condition of *Chlamydia pneumoniae*. *Korean J Clin Pathol* 1997;17:137-45.
- Frobes BA, Sahn DF, et al. eds. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. 12th ed. St. Louis: Mosby, 2007:756-59.
- Kuo CC and Grayston JT. Factors affecting viability and growth in HeLa 229 cells of *Chlamydia* sp. strain TWAR. *J Clin Microbiol* 1988;26:812-5.
- Maass M, Essig A, Marre R, Henkel W. Growth in serum-free medium improves isolation of *Chlamydia pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 1993;31:3050-2.
- Pruckler JM, Masse N, Stevens VA, Gang L, Yang Y, Zell ER, et al. Optimizing culture of *Chlamydia pneumoniae* by using multiple centrifugations. *J Clin Microbiol* 1999;37:3399-401.
- Tjhie JH, Roosendaal R, MacLaren DM, Vandenbroucke-Grauls CM. Improvement of growth of *Chlamydia pneumoniae* on HEp-2 cells by pretreatment with polyethylene glycol in combination with additional centrifugation and extension of culture time. *J Clin Microbiol* 1997;35:1883-4.
- Kazuyama Y, Lee SM, Amamiya K, Taguchi F. A novel method for isolation of *Chlamydia pneumoniae* by treatment with trypsin or EDTA. *J Clin Microbiol* 1997;35:1624-6.
- Roblin PM, Dumornay W, Hammerschlag MR. Use of HEp-2 cells for improved isolation and passage of *Chlamydia pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 1992;30:1968-71.
- Chirgwin K, Roblin PM, Gelling M, Hammerschlag MR, Schachter J. Infection with *Chlamydia pneumoniae* in Brooklyn. *J Infect Dis* 1991;163:757-61.
- Boman J, Allard A, Persson K, Lundborg M, Juto P, Wadell G. Rapid diagnosis of respiratory *Chlamydia pneumoniae* infection by nested touchdown polymerase chain reaction compared with culture and antigen detection by EIA. *J Infect Dis* 1997;175:1523-6.
- Verkooyen RP, Willemsse D, Hiep-van Casteren SC, Joulandan SA, Snijder RJ, van den Bosch JM, et al. Evaluation of PCR, culture, and serology for diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* respiratory infections. *J Clin Microbiol* 1998;36:2301-7.
- Apfalter P, Boman J, Nehr M, Hienerth H, Makrithathis A, Pauer J, et al. Application of blood-based polymerase chain reaction for detection of *Chlamydia pneumoniae* in acute respiratory tract infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001;20:584-6.
- Miyashita N, Obase Y, Fukuda M, Shouji H, Yoshida K, Ouchi K, et al. Evaluation of the diagnostic usefulness of real-time PCR for

detection of *Chlamydomytila pneumoniae* in acute respiratory infections. J Infect Chemother 2007;13:183-7.

26. Poppert S, Essig A, Marre R, Wagner M, Horn M. Detection and

differentiation of Chlamydiae by fluorescence in situ hybridization. Appl Environ Microbiol 2002;68:4081-9.

=국문초록=

Collagen-coated Polyethylene Terephthalate 디스크 Plate와 Shell Vial을 이용한 *Chlamydomytila pneumoniae* 배양법의 비교

경북대학교 의학전문대학원 임상병리학교실

김미혜, 이원길

배경: 호흡기 감염의 중요한 원인 중 하나인 *Chlamydomytila pneumoniae*의 정확한 진단을 위해서는 세포 배양을 통해 *C. pneumoniae*의 검출을 확인하는 것이 중요하다. 최근 콜라겐이 코팅된 polyethylene terephthalate 디스크(PET 디스크)를 polyester plate 용기에 넣어 사용하는 제품(CorePath, Daegu, Korea)이 개발되어 세포 배양에 이용되고 있다. 이에 저자는 PET 디스크 plate의 유용성을 평가하고 기존의 방법과 비교하기 위해 본 연구를 실시하였다.

방법: *C. pneumoniae* 배양이 의뢰된 환자 46명에서 채취한 29개의 객담과 17개의 혈액 검체를 대상으로 shell vial과 PET 디스크 plate (4-well)를 이용하여 배양하였고 결과가 상이한 경우 microimmunofluorescence (MIF) 결과를 비교하였다.

결과: HeLa-229 세포단층은 모든 shell vial과 PET 디스크 plate에서 관찰되었으며, 양성인 경우 *C. pneumoniae* 배양 결과 세포질 내에 하나의 둥근 봉입체가 형광 염색되었다. 두 검사법에서 판정이 일치하는 경우는 양성 20예와 음성 22예, 총 42예로 91.3%의 우수한 일치율($k=0.826$)을 보였다.

결론: PET 디스크 plate 배양법은 shell vial법의 결과와 비교하여 우수한 결과 일치율을 보였으며, 또한 plate와 디스크를 다루는 데에도 어려움이 없어 shell vial의 cover glass를 대신하여 PET 디스크 plate를 사용하여도 좋을 것으로 판단된다.

[대한임상미생물학회지 2010;13:73-78]

교신저자 : 이원길, 700-721, 대구시 중구 삼덕2가 50번지
경북대학교병원 진단검사의학과
Tel: 053-420-5292, Fax: 053-426-3367
E-mail: leewk@knu.ac.kr